

Giugno 2015

Manuale del pannello RespiFast RG



Versione 1

IVD

Diagnostica qualitativa in vitro

Per l'uso con strumenti Rotor-Gene® Q

CE
0120

REF

4693163



PathoFinder B.V., Randwycksingel 45, 6229 EG
Maastricht, PAESI BASSI

Distribuito da QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1,
40724 Hilden, GERMANIA

R1 **MAT**

1090425IT



Contenuto

Usò previsto	4
Sommario e spiegazioni	5
Principi della procedura	5
Geni bersaglio	7
Materiali in dotazione	10
Contenuto del kit	10
Materiali necessari ma non in dotazione	11
Avvertenze e precauzioni	12
Precauzioni generali	12
Conservazione e manipolazione dei reagenti	14
Conservazione e manipolazione dei campioni	14
Procedura	15
Estrazione e preparazione degli acidi nucleici	15
Utilizzo di un controllo negativo	16
Utilizzo di un controllo interno e del carrier RNA	16
Utilizzo del controllo di amplificazione	19
Utilizzo del controllo positivo	19
Protocollo: amplificazione mediante PCR e analisi della curva di melting	21
Interpretazione dei risultati	45
Normalizzazione	45
Analisi	45

Soglia.....	45
Guida alla risoluzione dei problemi.....	50
Controllo di qualità.....	51
Limiti della metodica.....	51
Caratteristiche delle prestazioni.....	52
Simboli.....	53
Informazioni sui contatti.....	54
Informazioni per gli ordini.....	55

Uso previsto

Il pannello RespiFast RG è un test per PCR multiplex qualitativa per rilevare e differenziare 16 virus a RNA,* 2 virus a DNA e 4 batteri, ciascuno dei quali può provocare infezioni delle vie aeree nell'uomo, precisamente: adenovirus, bocavirus, coronavirus OC43, coronavirus 229E, coronavirus NL63/HKU1, metapneumovirus umano (hMPV), virus dell'influenza A, virus dell'influenza B, virus dell'influenza A di sottotipo H1N1pdm09, virus della parainfluenza di tipo 1, virus della parainfluenza di tipo 2, virus della parainfluenza di tipo 3, virus della parainfluenza di tipo 4, rhinovirus/enterovirus, virus respiratorio sinciziale di tipo A (RSVA), virus respiratorio sinciziale di tipo B (RSVB), *Bordetella pertussis*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* e *Mycoplasma pneumoniae*.

Il pannello RespiFast RG è un valido ausilio nella diagnosi delle infezioni delle vie aeree se utilizzato in associazione ad altri riscontri clinici e di laboratorio. Eventuali risultati negativi non indicano necessariamente l'assenza di un'infezione virale o batterica delle vie aeree e non devono essere utilizzati come unica base per formulare una diagnosi, avviare una terapia o adottare altre decisioni terapeutiche. Eventuali risultati positivi non escludono la co-infezione da altri patogeni. I patogeni rilevati potrebbero non essere l'esatta causa della patologia.

Nella formulazione della diagnosi finale devono essere inclusi anche altri esami di laboratorio e la valutazione di manifestazioni cliniche. Il prodotto è concepito per l'uso esclusivamente da parte di esperti di laboratorio.

* Il pannello RespiFast RG rileva 16 virus a RNA, ma non differenzia fra rhinovirus e enterovirus e fra coronavirus HKU1 e coronavirus NL63.

Sommario e spiegazioni

Le infezioni acute delle vie aeree sono la tipologia di infezioni acute più diffusa negli adulti e nei bambini e rappresentano una significativa causa di malattia nei pazienti immunodepressi. Le infezioni delle vie aeree (RTI) vengono comunemente divise in infezione delle vie aeree superiori (URTI) e infezioni delle vie aeree inferiori (LRTI). Le URTI includono rinite, congiuntivite, faringite, otite media e sinusite. Le LRTI includono polmonite, bronchiolite e bronchite. Sia virus che batteri possono causare RTI acute e il numero di agenti responsabili è tanto ampio quanto diversificato, quindi pone una grande sfida alle metodologie diagnostiche.

I test di amplificazione degli acidi nucleici hanno dimostrato di essere alternative rapide, sensibili e specifiche sia nel formato singleplex che multiplex. I test multiplex consentono la co-amplificazione di più bersagli, fornendo informazioni sull'importanza delle infezioni miste e sulla prognosi e recrudescenza delle patologie respiratorie.

Principi della procedura

Il pannello RespiFast RG si basa sulla tecnologia SmartFinder®, che permette di effettuare un'analisi altamente complessa di un massimo di 14 bersagli in un'unica reazione PCR in tempo reale. Il pannello RespiFast RG contiene 23 diversi set di sonde MultiFast associate a 15 sonde fluorescenti SMART (single-tube multiplex amplification in real time, ossia amplificazione multiplex in tempo reale in provetta singola), che permettono di rilevare 22 diversi patogeni più un controllo interno e 2 controlli di amplificazione. La reazione inizia con una pre-amplificazione che unisce una fase di trascrittasi inversa ad una fase PCR per amplificare il cDNA bersaglio o il DNA. Successivamente, una parte della reazione di pre-amplificazione viene trasferita in due provette per PCR. Vengono eseguite due reazioni separate di Fase 2. Il rilevamento viene effettuato analizzando la curva di melting. La **Figura 1** illustra schematicamente il flusso di lavoro del test.

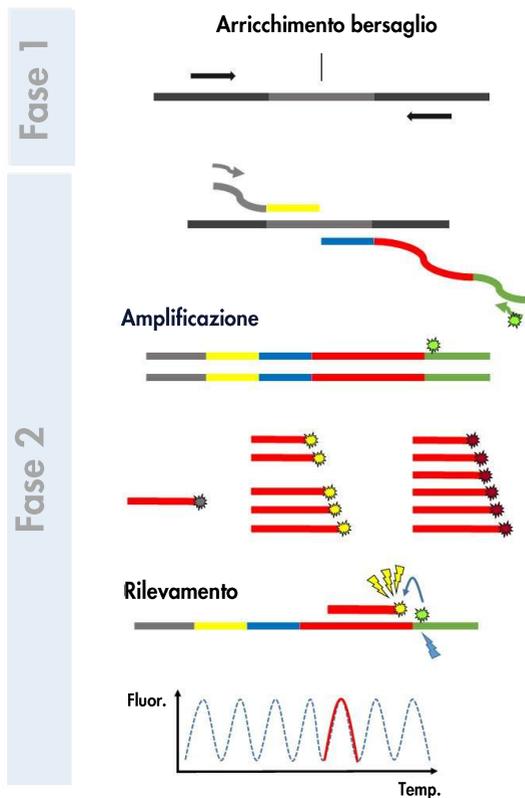


Figura 1. Schema del flusso di lavoro con il pannello RespiFast RG.

Il pannello RespiFast RG utilizza lo strumento Rotor-Gene Q MDx o Rotor-Gene Q per rilevare gli acidi nucleici patogeni.

Nel test viene incluso un controllo interno (IC) per differenziare fra campioni veri negativi e campioni falsi negativi per effetto della degradazione degli acidi nucleici, dell'inibizione della reazione PCR o del fallimento del test. Il pannello RespiFast RG contiene inoltre 2 controlli di amplificazione (AC) che consentono di discriminare condizionatamente tra il fallimento dell'estrazione e il fallimento dell'amplificazione nel test.

Il campione d'ingresso è formato da acidi nucleici totali estratti e purificati da tamponi nasofaringei. La preparazione dei campioni è un processo che esula da quello previsto dal pannello. Utilizzare tecniche o prodotti idonei per gestire i campioni ed estrarre e purificare gli acidi nucleici (vedere "Conservazione e manipolazione dei campioni", pag. 14 e "Estrazione e preparazione degli acidi nucleici", pag. 15).

Geni bersaglio

I geni bersagli utilizzati per il disegno di primer e sonde sono illustrati nella Tabella 1.

Tabella 1. Geni bersaglio del pannello RespiFast RG

Bersaglio	Gene	Codice patogeno
Controllo		
Controllo interno	Gene che codifica per la proteina di lisi del batteriofago MS2	IC
Controllo di amplificazione 1	sequenza artificiale univoca	AC1
Controllo di amplificazione 2	sequenza artificiale univoca	AC2
Virus		
Adenovirus	Gene esonico (H)	Adeno
Bocavirus	Gene non capsidico (NP1)	Boca
Coronavirus 229E	Gene che codifica per la proteina nucleocapsidica (NP)	229E
Coronavirus HKU1	Gene che codifica per la fosfoproteina nucleocapsidica (N)	HKU1
Coronavirus NL63	Gene che codifica per la proteina nucleocapsidica (NP)	NL63
Coronavirus OC43	Gene che codifica per la proteina nucleocapsidica (NP)	OC43
Metapneumovirus umano	Gene che codifica per la proteina nucleocapsidica (NP)	hMPV
Virus dell'influenza A	Gene che codifica per la proteina della matrice (M1)	InfA
Virus dell'influenza B	Gene che codifica per la proteina della matrice (M1)	InfB
Virus dell'influenza A di sottotipo H1N1pdm09	Gene che codifica per la neuraminidasi	H1N1
Virus della parainfluenza di tipo 1	Gene che codifica per l'emoagglutina-neuraminidasi (HN)	PIV1
Virus della parainfluenza di tipo 2	Gene che codifica per l'emoagglutina-neuraminidasi (HN)	PIV2
Virus della parainfluenza di tipo 3	Gene che codifica per l'emoagglutina-neuraminidasi (HN)	PIV3
Virus della parainfluenza di tipo 4	Gene che codifica per la proteina nucleocapsidica maggiore (N)	PIV4
Rhinovirus/ Enterovirus	Gene che codifica per la poliproteina della regione 5' non tradotta (PP)	Rhino/Entero
Virus respiratorio sinciziale tipo A	Gene che codifica per la proteina non strutturale	RSVA
Virus respiratorio sinciziale tipo B	Gene che codifica per la nucleoproteina	RSVB

Bersaglio	Gene	Codice patogeno
Batteri		
<i>Bordetella pertussis</i>	Sequenza di inserzione 481 (IS481)	B. pert
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	Gene che codifica per la proteina di membrana esterna maggiore (OmpA)	C. pneu
<i>Legionella pneumophila</i>	Gene che codifica per il potenziatore di infettività dei macrofagi (Mip)	L. pneu
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Gene che codifica per la proteina citoadesina (P1)	M. pneu

Per ogni campione vengono eseguite una pre-amplificazione (fase 1) e due reazioni di Fase 2. I patogeni, le etichette e la T_m indicata per le corrispondenti sonde di ibridazione SMART nelle 2 reazioni RespiFast sono riportati nella Tabella 2.

Tabella 2. Bersagli e corrispondenti valori di T_m delle sonde SMART

Etichetta	Sonda SMART	Range di accettazione T_m (°C)	Codice patogeno (miscela 1)	Codice patogeno (miscela 2)
Cy [®] 5	Sonda Cy5 1	50,5-53,5*	L. pneu	OC43
	Sonda Cy5 2a	55-58	B. pert	–
	Sonda Cy5 2b	52,5-55,5	–	HKU1/NL63
	Sonda Cy5 3	60,5-63,5 58,5-61,5	Rhino/Entero	229E
	Sonda Cy5 4	66,5-69,5	C. pneu	–
	Sonda Cy5 5	70,5-73,5	M. pneu	–
ROX [™]	Sonda Cy5 6	76-79	–	H1N1
	Sonda ROX 1	53,5-56,5	RSVA	PIV1
	Sonda ROX 2	58-61	Adeno	PIV2
	Sonda ROX 3	62,5-65,5	hMPV	PIV3
	Sonda ROX 4	66,5-69,5	RSVB	PIV4
	Sonda ROX 5	72,5-75,5	InfA	Boca
	Sonda ROX 6	76,5-79,5	InfB	–

Etichetta	Sonda SMART	Range di accettazione T_m (°C)	Codice patogeno (miscela 1)	Codice patogeno (miscela 2)
BHQ [®] 1	Sonda BHQ1 1	70,5-73,5	IC	IC
	Sonda BHQ1 AC1	61-64	AC1	–
	Sonda BHQ1 AC2	55,5-58,5	–	AC2

* I picchi della sonda Cy5 1 a volte appaiono come picco doppio. Il valore T_m del secondo picco è quello corretto.

Materiali in dotazione

Contenuto del kit

Pannello RespiFast RG		(25)
N° catalogo		4693163
N° di reazioni		25
Contenuto	Colore del tappo	Volume
Pre-amplification master mix (miscela master per pre-amplificazione)	Viola	>160 µl
Pre-amplification primer mix (miscela di primer per pre-amplificazione)	Bianco	>220 µl
RespiFast buffer 1 (tampone 1 RespiFast) (contiene AC1)	Rosso	>500 µl
RespiFast buffer 2 (tampone 2 RespiFast) (contiene AC2)	Blu	>500 µl
RespiFast enzyme (enzima RespiFast)	Arancione	>55 µl
Internal Control (IC) (controllo interno)	Nero	>450 µl
Positive Control (PC) (controllo positivo)	Verde	>50 µl
Tampone di diluizione	Trasparente	>1500 µl
<i>RespiFast RG Panel Handbook</i> (Manuale del pannello RespiFast RG) (inglese)		1 pc

Materiali necessari ma non in dotazione

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le rispettive schede tecniche di sicurezza (SDS), reperibili presso il fornitore.

Reagenti

- Kit di estrazione dell'RNA/DNA (vedere "Estrazione e preparazione degli acidi nucleici", pag. 15)
- Acqua esente da RNasi/DNasi

Materiali di consumo

- Puntali monouso con filtri idrofobici
- Puntali monouso "low retention" con filtri idrofobici
- Provette da 1,5 ml esenti da RNasi/DNasi
- Provette per PCR da 0,2 ml esenti da RNasi/DNasi (provette singole con tappi o provette per strisce con tappi singoli)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (provette per strisce e tappi, 0,1 ml) (cat. n° 981103 o 981106) da utilizzare con gli strumenti Rotor-Gene Q

Attrezzatura

- Pipette regolabili:* 0,1–2 µl, 2–20 µl, 20–200 µl
- Agitatore vortex*
- Centrifuga da banco* con rotore per provette da 2 ml
- Centrifuga* per provette di reazione da 0,2 ml

* Assicurarsi che gli strumenti siano stati revisionati e calibrati secondo le raccomandazioni del produttore.

- Blocco di raffreddamento o ghiaccio
- Termociclatore* per provette per PCR da 0,2 ml con coperchio riscaldato e velocità di ramping di 1–5°C/secondo (per pre amplificazione; es. termociclatore basato sul blocco GeneAmp® PCR System 9700)
- Strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM* o Rotor-Gene Q 5plex HRM* e relativi accessori

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico in vitro

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per ulteriori informazioni, consultare le appropriate schede di sicurezza (SDS). Le schede SDS, nel pratico e compatto formato PDF, sono disponibili online all'indirizzo www.qiagen.com/safety. Qui è possibile trovare, visualizzare e stampare la scheda SDS per ciascun kit QIAGEN® e i relativi componenti.

Per le informazioni sulla sicurezza riguardanti il kit di purificazione utilizzato, consultare il manuale del relativo kit. Per le informazioni antinfortunistiche riguardanti gli strumenti, fare riferimento al manuale del relativo strumento.

Smaltire i campioni e i residui dei test secondo le locali disposizioni in materia di sicurezza.

Precauzioni generali

Attenersi sempre a quanto segue:

- Questo test molecolare deve essere effettuato esclusivamente da personale di laboratorio qualificato.

- Conservare ed estrarre i materiali positivi (campioni e controlli positivi) separatamente da tutti gli altri reagenti e aggiungerli alla miscela di reazione in un ambiente fisicamente separato.
- Indossare guanti monouso durante il test.
- Utilizzare puntali monouso con filtri idrofobici per prevenire una possibile cross-contaminazione.
- Utilizzare puntali monouso "low retention" con filtri idrofobici per la manipolazione della miscela master per pre-amplificazione e dell'enzima RespiFast.
- Utilizzare provette per PCR esenti da RNasi/DNasi.
- Scongelare sempre i campioni RNA/DNA su ghiaccio e conservarli su ghiaccio o su un blocco di raffreddamento.
- Conservare sempre gli enzimi su ghiaccio o su un blocco di raffreddamento dopo averli prelevati dal freezer. Manipolare gli enzimi con cura e miscelarli molto delicatamente.
- Dopo lo scongelamento, centrifugare i reagenti per 5 secondi in una centrifuga e miscelarli aspirando e rilasciando delicatamente con una pipetta.
- Tutti i programmi di ciclizzazione devono essere immessi nel software del Rotor-Gene Q prima dell'esecuzione del test.
- Centrifugare sempre brevemente le piastre e provette per PCR e aprirle con attenzione per evitare la formazione di aerosol.

Nota: Per evitare una possibile contaminazione, si raccomanda vivamente di eseguire le attività sperimentali in stazioni per PCR, nelle seguenti 3 aree separate:

Area 1: Preparare miscele master per pre-amplificazione e analisi della curva di melting/fase 2.

Area 2: Aggiungere il campione RNA/DNA alla miscela.

Area 3: Eseguire la pre-amplificazione fase 2 e l'analisi della curva di melting in 2 fasi:

- Eseguire la pre-amplificazione.
- Aggiungere i prodotti per pre-amplificazione alla miscela di fase 2 (preferibilmente all'interno di una stazione per PCR) ed effettuare l'analisi della curva di melting e di fase 2.

Conservazione e manipolazione dei reagenti

I componenti del pannello RespiFast RG devono essere conservati al buio ad una temperatura compresa tra -30 e -15°C e sono stabili fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. Evitare ripetuti scongelamenti e congelamenti (più di cinque volte), perché ciò potrebbe ridurre le prestazioni del test.

Conservazione e manipolazione dei campioni

Il rilevamento di patogeni delle vie aeree dipende dalla raccolta di campioni di alta qualità, dal rapido trasporto dei campioni al laboratorio e dall'adeguata conservazione degli stessi prima di eseguire l'analisi di laboratorio. I tamponi nasofaringei sono idonei per rilevare infezioni virali e/o batteriche delle vie aeree.

I campioni clinici devono essere trasportati in laboratorio non appena possibile e, qui, aliquotati e processati. I campioni devono essere conservati a 4°C. Se non è possibile processare i campioni entro 48 ore, occorre surgelarli oppure conservarli ad una temperatura pari o inferiore a -20°C, preferibilmente -70°C.

Procedura

Estrazione e preparazione degli acidi nucleici

Il kit QIAamp® MinElute® Virus Spin e il kit QIASymphony® DSP Virus/Pathogen Mini di QIAGEN, illustrati nella Tabella 3, sono convalidati per la purificazione del DNA e dell'RNA da tipologie di campioni umani che possono essere impiegati con il pannello RespiFast RG. Eseguire la purificazione degli acidi nucleici rispettando le istruzioni riportate nel manuale del kit.

Tabella 3. Kit di purificazione convalidato per l'uso con il pannello RespiFast RG

Tipo di campione	Kit di isolamento degli acidi nucleici	Numero di catalogo (QIAGEN)
Tamponi nasofaringei	QIAamp MinElute Virus Spin Kit (50)	57704
	Kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini con protocollo Complex 200	937036

Utilizzare 200 µl del campione ed eluirlo in 60 µl di tampone di eluizione. Si raccomanda vivamente di non concentrare gli acidi nucleici, poiché ciò potrebbe aumentare il rischio di inibizione degli enzimi RT-PCR. Un controllo interno viene aggiunto al campione lisato (vedere "Utilizzo di un controllo interno e del carrier RNA", pag. 16).

Quando si utilizza il kit QIAamp MinElute Virus Spin, si consiglia di aggiungere il tampone di lisi al campione in una stazione a flusso d'aria laminare. Dopo la lisi del campione, è possibile continuare la procedura di estrazione su un banco di lavoro. Terminata l'operazione, si consiglia di decontaminare la stazione a flusso d'aria laminare con una

soluzione di decontaminazione (es. candeggina 1000 ppm)* e radiazione UV per la durata di 30 minuti.

Evitare il più possibile cicli di congelamento-scongelo del DNA/RNA estratto e conservare gli acidi nucleici estratti a 4°C se si prevede di processarli entro un giorno. In caso di tempi più lunghi, conservare il DNA/RNA estratto a -20°C o -70°C.

Utilizzo di un controllo negativo



Ogni processo deve includere un controllo negativo. Un controllo negativo è costituito da 200 µl di acqua di grado PCR e dal controllo interno (IC). Il controllo negativo viene trattato come un normale campione, inclusa la procedura di estrazione degli acidi nucleici. Nell'analisi finale il segnale del controllo negativo funge da riferimento per il segnale di fondo nei canali FAM/ROX e FAM/Cy5 e per i segnali IC e AC positivi nel canale Green (verde).

Utilizzo di un controllo interno e del carrier RNA

L'utilizzo del kit QIAamp MinElute Virus Spin o del kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini in combinazione con il pannello RespiFast RG richiede l'inserimento di un controllo interno (IC) nella procedura di purificazione per monitorare l'efficacia della preparazione dei campioni e del test a valle. Inoltre, sia il kit QIAamp MinElute Virus Spin che il kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini richiedono la preparazione del carrier RNA.

L'IC è un batteriofago MS2 che viene inserito come controllo per la lisi, l'estrazione dell'RNA/DNA, l'esecuzione del pannello RespiFast RG e anche per verificare una possibile inibizione della reazione PCR. L'IC viene aggiunto al tampone di lisi unitamente al carrier

* Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le rispettive schede tecniche di sicurezza (SDS), reperibili presso il fornitore.

RNA prima di aggiungere il campione. La quantità di IC addizionato non dipende dal volume iniziale del campione.

La quantità di IC addizionato dipende dal volume di eluizione. Se si utilizza il kit QIAamp MinElute Virus Spin, l'RNA/DNA estratto verrà eluito in 60 µl. Il volume di IC da aggiungere al tampone AL è di 5,5 µl per campione (vedere Tabella 4).

In caso di forte infezione e/o di infezioni multiple, il picco di melting dell'IC potrebbe non essere visibile nell'analisi finale. Ciò si spiega con il fatto che elevate quantità di acidi nucleici patogeni consumano gran parte dei reagenti presenti nel test. Di conseguenza, se il segnale IC è assente in presenza di uno o più picchi di melting specifici che indicano un'infezione, il test è comunque valido.

Tabella 4. Volumi di tampone AL, miscela di carrier RNA-tampone AVE e IC richiesti con l'estrazione del kit QIAamp DSP Virus Spin

Numero dei campioni	Volume tampone AL (ml)	Volume carrier RNA-AVE (µl)	Volume controllo interno (µl)
1	0,22	6,2	5,5
2	0,44	12,3	11
3	0,66	18,5	16,5
4	0,88	24,6	22
5	1,1	30,8	27,5
6	1,32	36,9	33
7	1,54	43,1	38,5
8	1,76	49,2	44
9	1,98	55,4	49,5
10	2,2	61,5	55
11	2,42	67,7	60,5
12	2,64	73,8	66

L'utilizzo del kit QIASymphony DSP QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini in combinazione con il pannello RespiFast RG richiede l'inserimento di un controllo interno nella procedura di purificazione per monitorare l'efficacia della preparazione dei campioni e del test a valle.

Per il calcolo del controllo interno (IC) si raccomanda di utilizzare l'"IC Calculator" (calcolatore CI) inserito nella QIASymphony Management Console (QMC).

Il volume di eluizione garantito di 60 µl richiede un volume effettivo di 90 µl di tampone di eluizione, che viene aggiunto dallo strumento al campione. La quantità di IC aggiunto per campione è di 7,5 µl. Per tale motivo, impostare il rapporto controllo interno/campione a 7,5 all'interno dell'"IC Calculator" della QIASymphony Management Console (QMC).

La Tabella 5 descrive l'aggiunta del controllo interno al campione nel rapporto di 7,5 µl per campione. Si consiglia di preparare miscele fresche per ogni processo di analisi subito prima dell'uso.

Tabella 5. Preparazione del carrier RNA e del controllo interno

Componente	n = numero di campioni e controlli	
	n ≤ 13	n ≥ 13
	Volume (µl) (provette Sarstedt)*	Volume (µl) (provette CO)†
Soluzione madre con carrier RNA (CARRIER)	$(n + 3) \times 3$	$(n + 5) \times 3$
Controllo interno	$(n + 3) \times 7,5$	$(n + 5) \times 7,5$
Tampone AVE	$(n + 3) \times 109,5$	$(n + 5) \times 109,5$
Volume finale per campione (volume morto escluso)	120	120
Volume totale per n campioni	$(n + 3) \times 120$	$(n + 5) \times 120$

* Microprovette da 2,0 ml tipo H e microprovette da 2,0 ml tipo I (Sarstedt, cat. n. 72.693 e 72.694). Se si prepara il controllo interno come soluzione madre in una provetta più grande, moltiplicare il volume totale di ogni componente per il numero di provette di controllo interno utilizzate. È necessaria una miscela di controllo interno corrispondente a 3 campioni supplementari (ossia 360 µl). Non riempire per un volume totale superiore a 1,92 ml (corrispondente ad un massimo di 13 campioni).

Se si utilizzano più di 13 reazioni nelle microprovette da 2,0 ml, impostare le reazioni in una provetta più grande e caricare in provette multiple. Verificare che a ogni provetta sia aggiunto il necessario volume in eccesso pari a 3 reazioni supplementari.

¹ Provette da 14 ml, 17 x 100 mm, in polistirene a fondo tondo (Corning ex Becton Dickinson, cat. n° 352051). È necessaria una miscela di controllo interno corrispondente a 5 campioni supplementari (ossia 600 µl). Non riempire per un volume totale superiore a 13,92 ml.

Utilizzo del controllo di amplificazione

Entrambi i tamponi RespiFast 1 e 2 contengono un controllo di amplificazione (AC) specifico per quel tampone RespiFast. L'AC controlla la seconda parte del protocollo RespiFast: aggiunta corretta di reagenti e applicazione del corretto protocollo PCR e della curva di melting. AC 1 e AC 2 vengono rilevati da una sonda di rilevazione BHQ1 e mostrano valori T_m differenti, consentendo la rilevazione della miscelazione delle reazioni della miscela 1 e della miscela 2.

La reazione AC può essere surclassata nella reazione ogni volta che viene rilevata una forte infezione. Nel caso in cui non venga rilevato nessun patogeno nella reazione, AC deve presentare un picco di melting, per convalidare l'assenza di reazioni di patogeni in quella reazione.

In presenza di una forte infezione in una delle miscele RespiFast di un campione, l'IC può rimanere non rilevato in quella miscela RespiFast e nella corrispondente miscela RespiFast poiché è stato surclassato dal patogeno durante la pre-amplificazione. In quel caso, la presenza dell'AC nella corrispondente miscela RespiFast garantisce che in entrambe le miscele RespiFast si è verificata l'amplificazione corretta.

Utilizzo del controllo positivo

Il pannello RespiFast RG contiene un controllo positivo formato da un DNA plasmidico contenente le sequenze bersaglio di 4 patogeni rilevabili con il test. Tabella 6 fornisce una panoramica del contenuto del controllo positivo. Il controllo positivo non deve essere estratto e viene ulteriormente gestito come campione regolare nel protocollo RespiFast RG. L'utilizzo

del controllo positivo nel processo con un pannello RespiFast RG è consigliato ma non obbligatorio.

Tabella 6. Controllo positivo

Bersaglio	Miscela di rilevazione	Canale di rilevazione	T_m medio
Influenza A	Miscela 1	FAM/ROX	74°C
<i>Bordetella pertussis</i>	Miscela 1	FAM/Cy5	56,5°C
Virus della parainfluenza di tipo 2	Miscela 2	FAM/ROX	59,5°C
Coronavirus 229E	Miscela 2	FAM/Cy5	60°C

Protocollo: amplificazione mediante PCR e analisi della curva di melting

Prima di iniziare

- Scongellare l'RNA/DNA stampo (se congelato) e tutti i reagenti e conservare le provette su ghiaccio.
- Preparare quantità leggermente superiori al necessario delle varie miscele per compensare eventuali perdite di pipettatura.

Procedura

Pre-amplificazione

1. Capovolgere più volte la miscela master per pre-amplificazione per garantire un completo scongelamento e l'omogeneizzazione della miscela master. Centrifugare brevemente la provetta. Preparare la reazione di pre-amplificazione e miscelarla come indicato nella Tabella 7, poi conservarla su ghiaccio.

La miscela di reazione contiene tipicamente tutti i componenti necessari per la PCR, ad eccezione del campione.

Nota: Le miscele di fase 2 possono essere preparate contemporaneamente alla miscela di pre-amplificazione e devono essere conservate al buio a 4°C fino al momento dell'utilizzo. La preparazione simultanea delle miscele può avvenire esclusivamente se si esegue l'intero protocollo senza ritardi di alcun tipo; non sono ammesse pause fra le due fasi. Dopo una conservazione prolungata (ad es. durante la notte) non è garantita la stabilità delle miscele.

Tabella 7. Preparazione della miscela di reazione per pre-amplificazione

Numero di campioni (colore del tappo della provetta di reagente)	1	12
Miscela master per pre-amplificazione (viola)	6,25 µl	75 µl
Miscela di primer per pre-amplificazione (bianco)	8,75 µl	105 µl
Volume totale	15 µl	180 µl

- Miscelare la miscela di reazione per pre-amplificazione delicatamente ma con cura, quindi pipettare 15 µl della miscela in ciascuna provetta per PCR da 0,2 ml. Aggiungere poi 10 µl del campione di DNA/RNA eluito, del controllo negativo o del controllo positivo (vedere Tabella 8).
- Chiudere le provette per PCR. Miscelare accuratamente. Centrifugare brevemente le provette, poi riposizionarle su ghiaccio o su un blocco di raffreddamento.

Tabella 8. Preparazione delle reazioni per pre-amplificazione

Numero dei campioni	1	12
Miscela di reazione per pre-amplificazione	15 µl	15 L ciascuno
Campione, controllo negativo o positivo	10 µl	10 µl ciascuno
Volume totale	25 µl	25 µl ciascuno

- Programmare il termociclatore basato su blocco come indicato nella **Tabella 9**.

Tabella 9. Programma del termociclatore per la pre-amplificazione

Trascrittasi inversa:	10 minuti	50°C
Fase di attivazione iniziale:	2 minuti	95°C
Ciclizzazione a 3 fasi:		
Denaturazione	20 secondi	94°C
Annealing	20 secondi	55°C
Estensione	35 secondi	72°C
Numero di cicli	40	
Mantenimento:	–	20°C

5. Avviare il programma di pre-amplificazione mentre le provette per PCR sono ancora su ghiaccio. Attendere che il termociclatore raggiunga 50°C. Poi collocare le provette nel blocco del termociclatore e chiudere il coperchio riscaldato.

Fase 2 pannello RespiFast RG

6. Creare un profilo termico per lo strumento Rotor-Gene Q come di seguito indicato. Una panoramica del programma del termociclatore è illustrata nella Tabella 10.

Impostazione dei parametri generali del test	Figura 2, Figura 3
Creazione di nuovi canali	Figura 4 - Figura 7
Modifica del gain	Figura 8, Figura 9
Programmazione del profilo termico	Figura 10 - Figura 15
Programmazione del programma di melting	_Figura 16, Figura 17_
Riepilogo e salvataggio dello stampo	_Figura 18, Figura 19_
Avvio del processo	Figura 20

Tutte le specifiche sono relative al software Rotor-Gene Q, versione 2.3. Per ulteriori informazioni sulla programmazione degli strumenti RotorGene consultare il relativo

manuale utente. Nelle illustrazioni queste impostazioni sono evidenziate da una cornice nera spessa. Le illustrazioni incluse riguardano anche gli strumenti Rotor-Gene Q.

Tabella 10. Panoramica del programma del termociclatore per la ciclizzazione di Fase 2

			Commenti
Fase di denaturazione iniziale:	2 minuti	95°C	
PCR 1: Ciclizzazione a 3 fasi:			PCR ad alta specificità
Denaturazione	15 secondi	94°C	
Annealing	15 secondi	55°C	
Estensione	15 secondi	72°C	
Numero di cicli	10		
PCR 2: Ciclizzazione a 3 fasi:			
Denaturazione	15 secondi	94°C	
Annealing	15 secondi	50°C	Acquisizione*
Denaturazione	15 secondi	72°C	
Numero di cicli	23		
Denaturazione:	2 minuti	95°C	
Programma di melting	–	40-90°C	Acquisizione [†]

* Canali di acquisizione: Green, gain 4; Red (rosso), gain 1; FAM™/ROX, gain 8; e FAM/Cy5, gain 10.

[†] Canali di acquisizione: Green, Red, FAM/ROX e FAM/Cy5. Utilizzare "Optimize gain before melt on all tubes" (Ottimizza gain prima del melting su tutte le provette). "The gain giving the highest fluorescence less than 95 will be selected". (Verrà selezionato il gain che dà la massima fluorescenza meno 95)

7. Innanzitutto, aprire la finestra di dialogo “New Run Wizard” (Procedura guidata nuovo processo)(**Figura 2**). Spuntare la casella “Locking Ring Attached” (Anello di bloccaggio collegato) e cliccare su “Next” (Avanti).

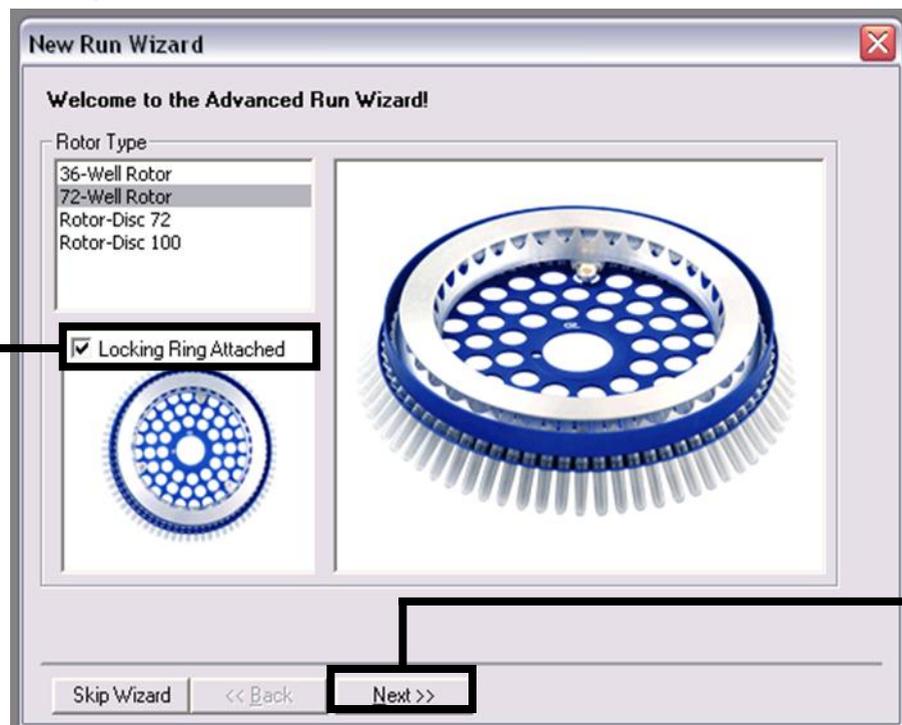


Figura 2. Finestra di dialogo “New Run Wizard”.

8. Selezionare 25 per il volume di reazione e cliccare su "Next" (Figura 3).

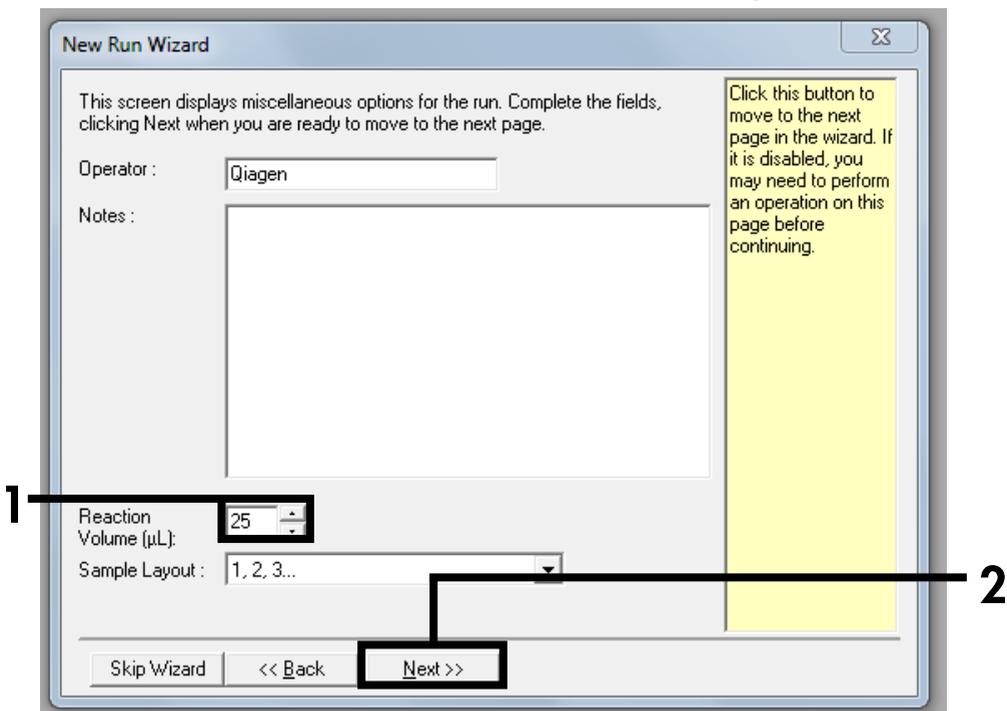


Figura 3. Impostazione dei parametri generali del test.

9. Cliccare sul pulsante “Create New” (Crea nuovo) nella successiva finestra di dialogo “New Run Wizard” (**Figura 4**) e programmare 2 ulteriori canali, come illustrato nelle **Figura 5 - Figura 7**.

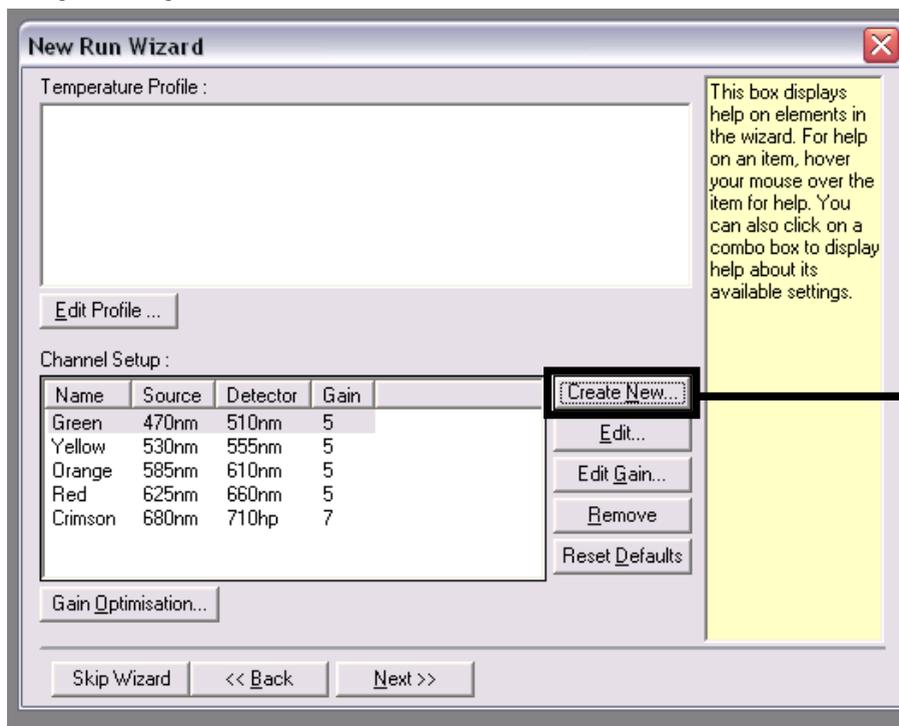


Figura 4. Creazione di nuovi canali.

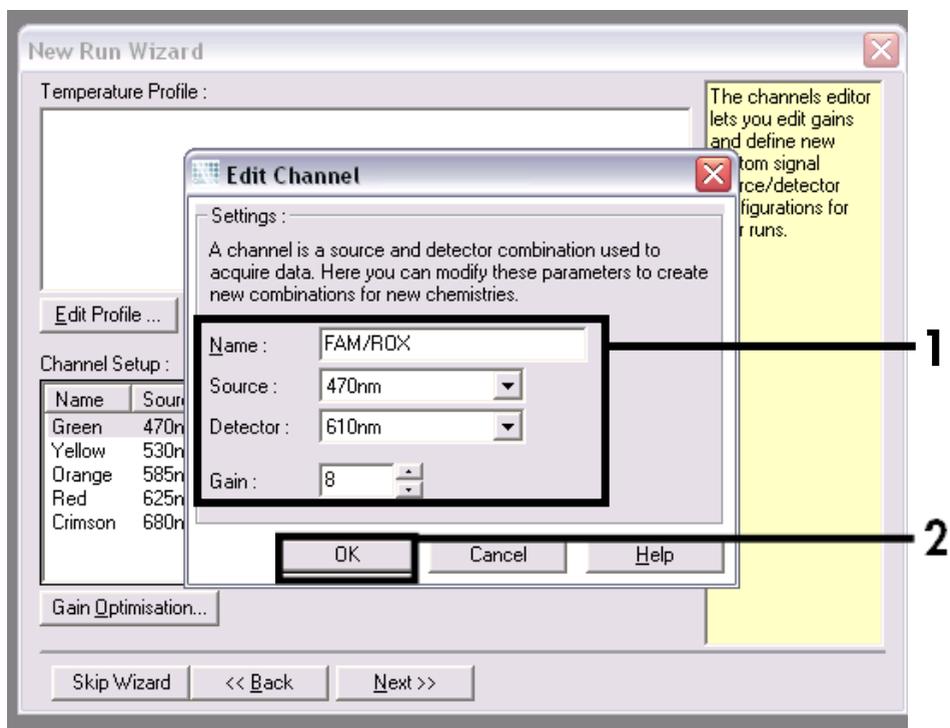


Figura 5. Creazione del nuovo canale "FAM/ROX".

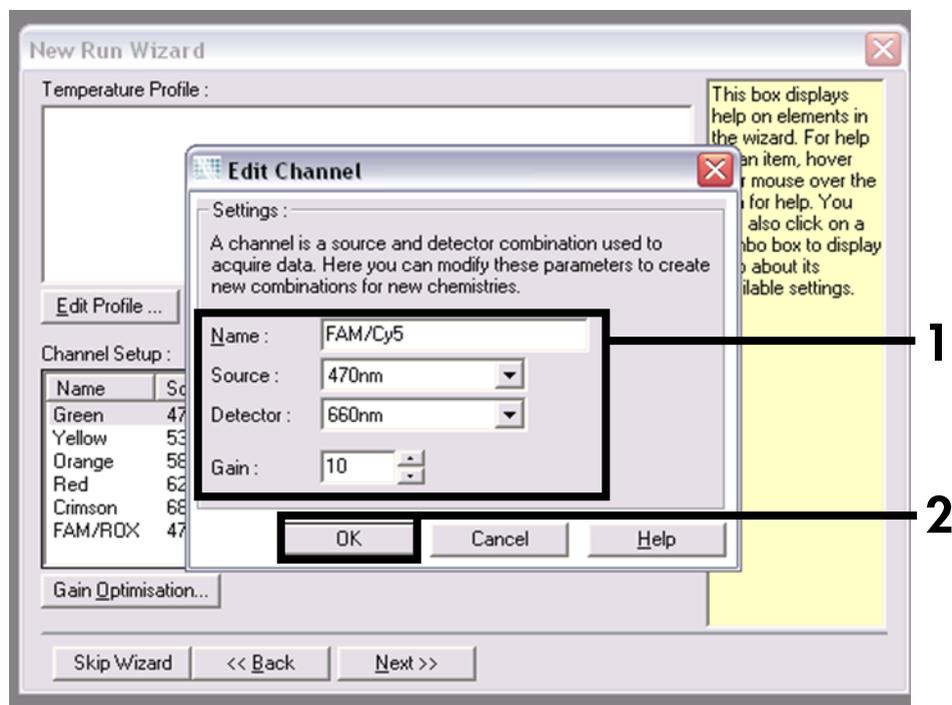


Figura 6. Creazione del nuovo canale "FAM/Cy5".

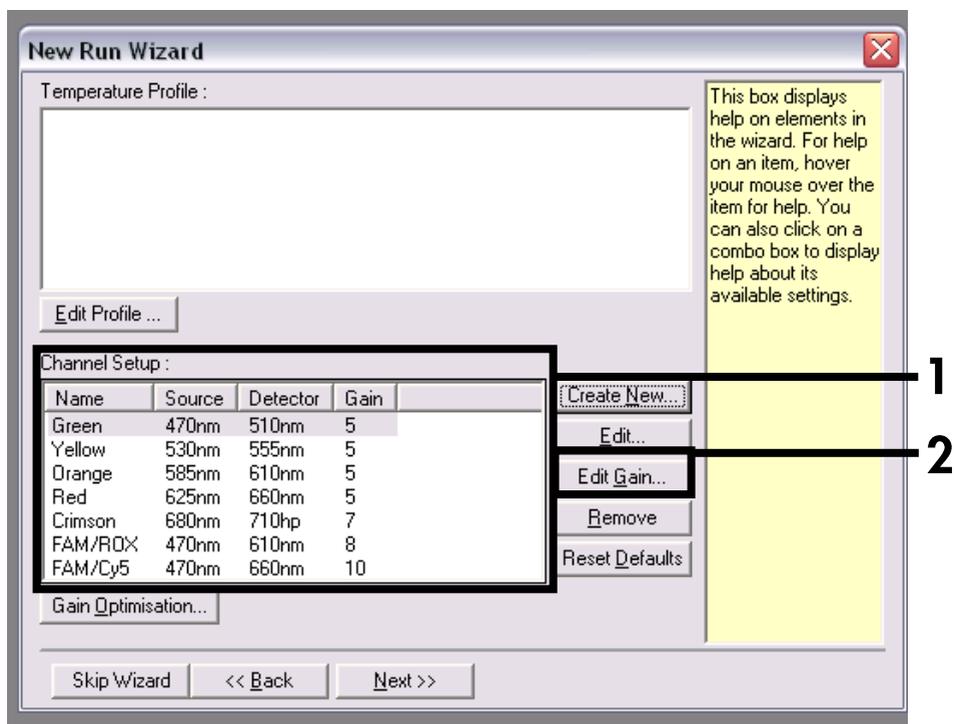


Figura 7. Inclusione di nuovi canali.

10. Modificare il gain per ogni canale, come illustrato nella **Figura 8**. Le impostazioni del gain finale per ogni canale sono illustrate nella **Figura 9**.

Sono selezionate le impostazioni del gain per lo strumento Rotor-Gene Q per impedire la saturazione nei canali di rilevazione. Tuttavia, se si osserva saturazione in uno qualsiasi dei canali di rilevazione, occorre adattare le impostazioni del gain per questo canale saturato ed effettuare una nuova analisi della curva di melting.

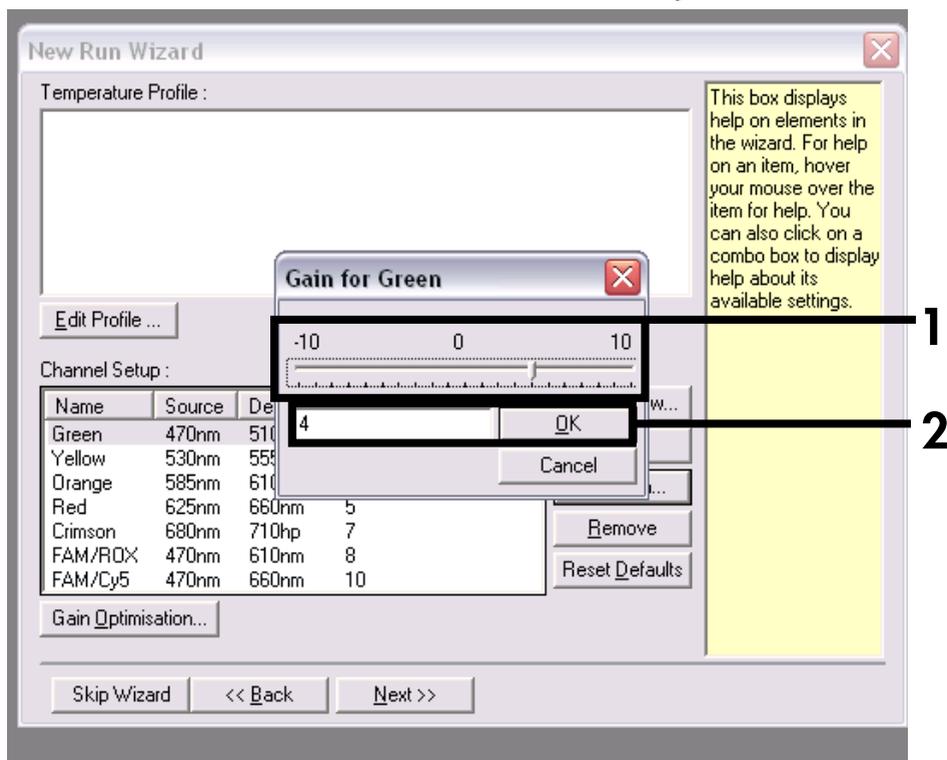


Figura 8. Modifica del gain. La figura mostra a titolo d'esempio l'impostazione del gain a 4 per il canale di ciclizzazione Green.

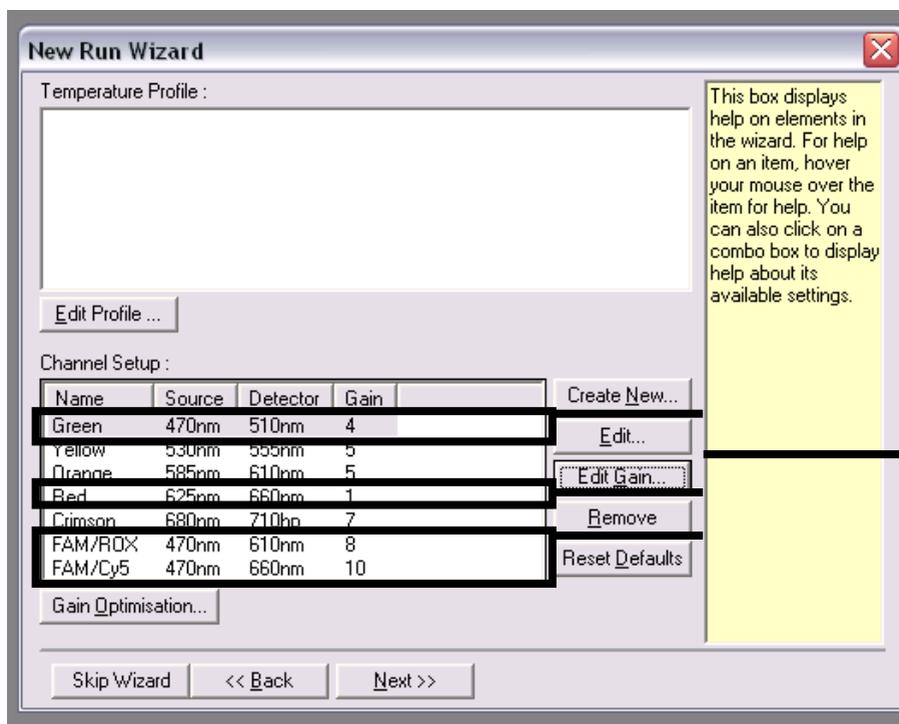


Figura 9. Impostazioni finali del gain per tutti i canali. I canali necessari sono: Green, gain 4; Red, gain 1; FAM/ROX, gain 8; e FAM/Cy5, gain 10.

11. Cliccare sul pulsante “Edit Profile” (Modifica profilo) nella successiva finestra di dialogo “New Run Wizard” (Figura 10) e programmare il profilo termico, come illustrato nelle Figura 11 - Figura 16.

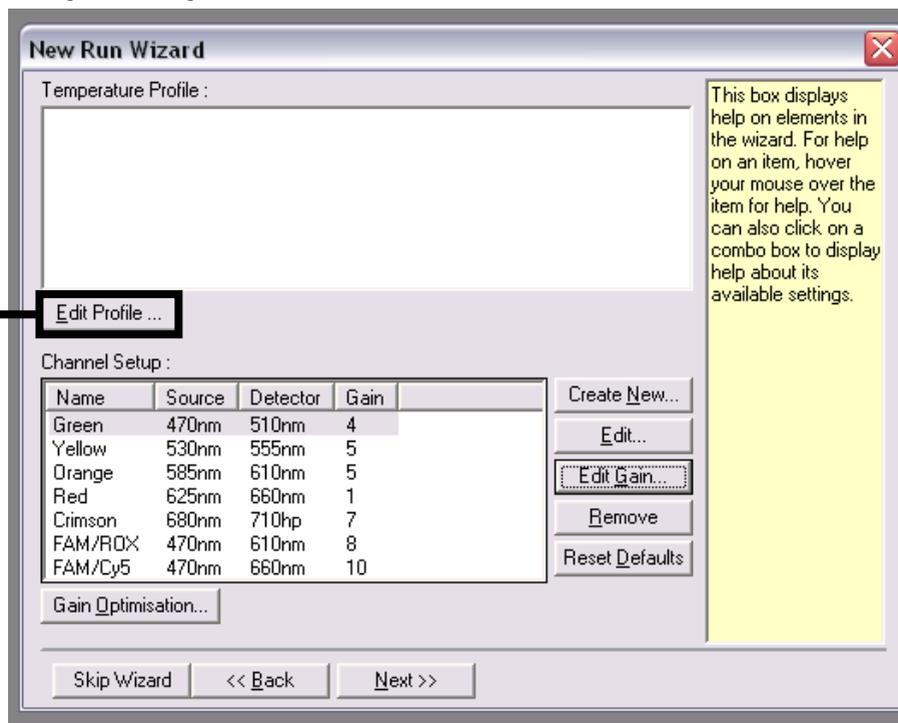


Figura 10. Modifica del profilo.

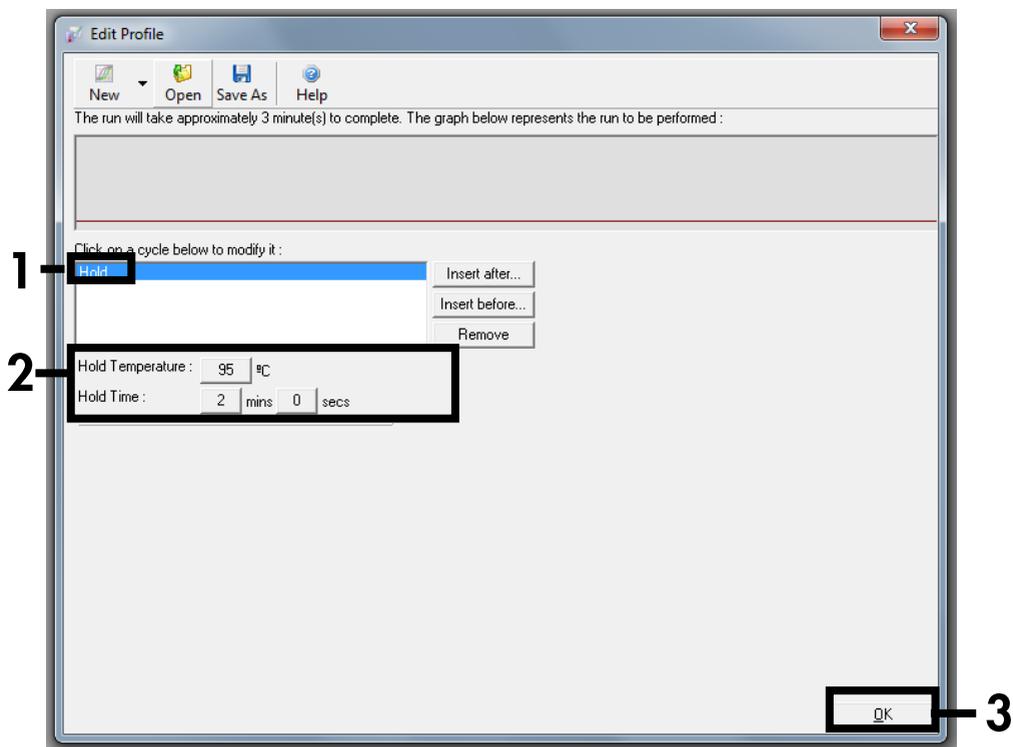


Figura 11. Fase di denaturazione iniziale.

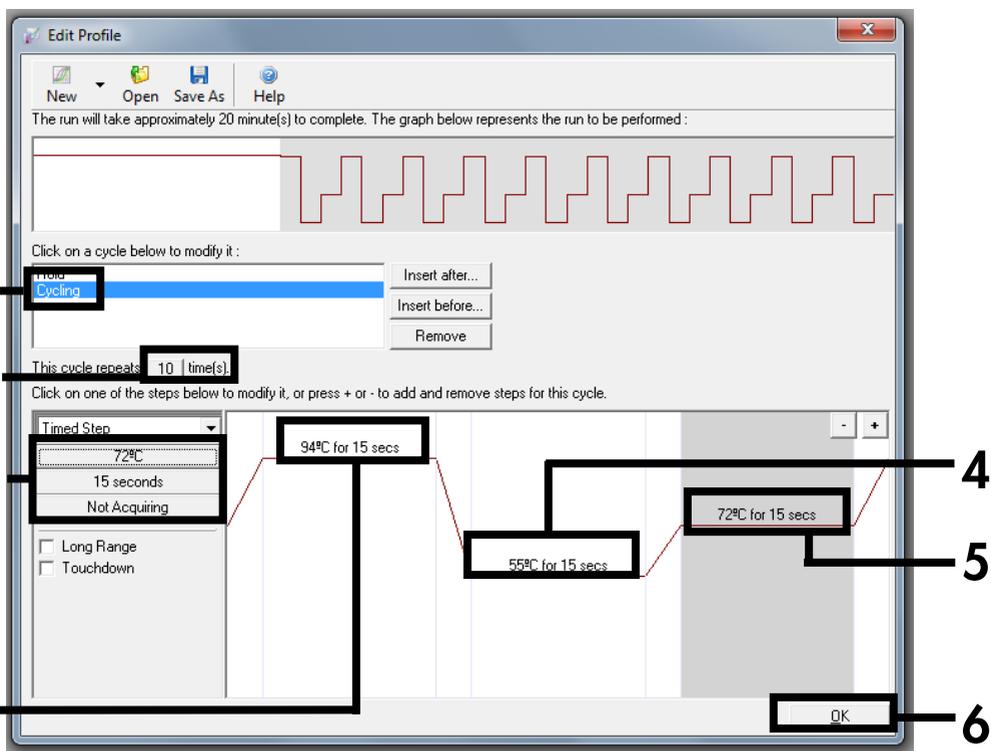


Figura 12. PCR 1.

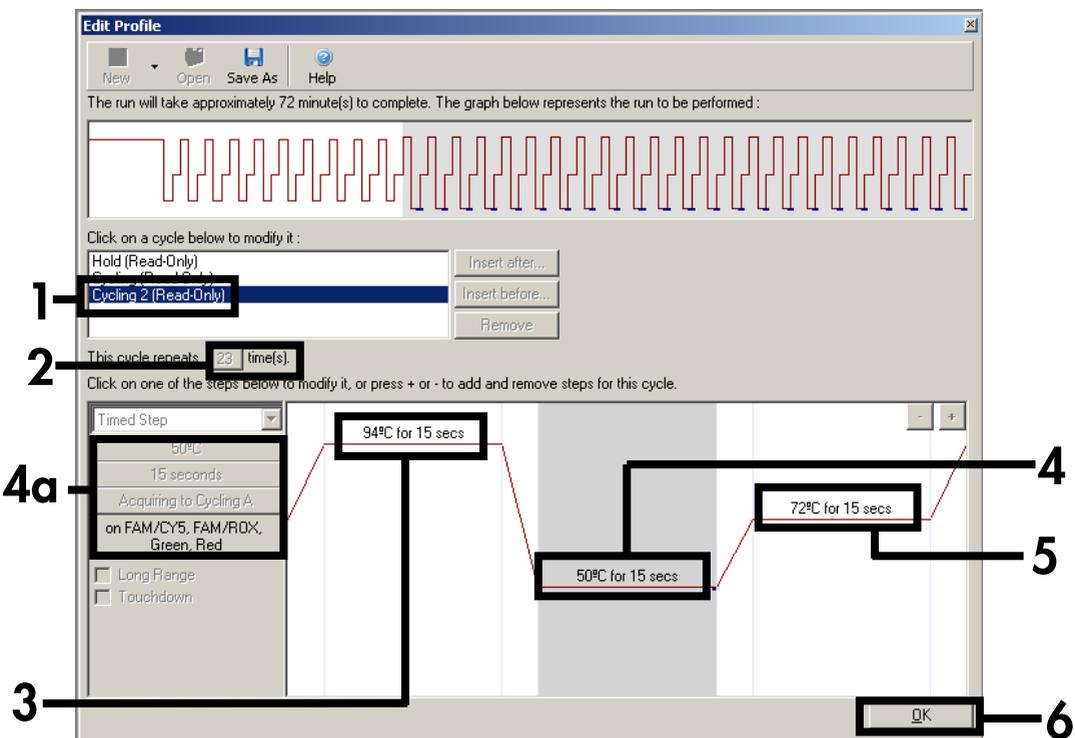


Figura 13. PCR 2 inclusa acquisizione del segnale a 50°C. I canali necessari per l'acquisizione sono illustrati nella Figura 14.

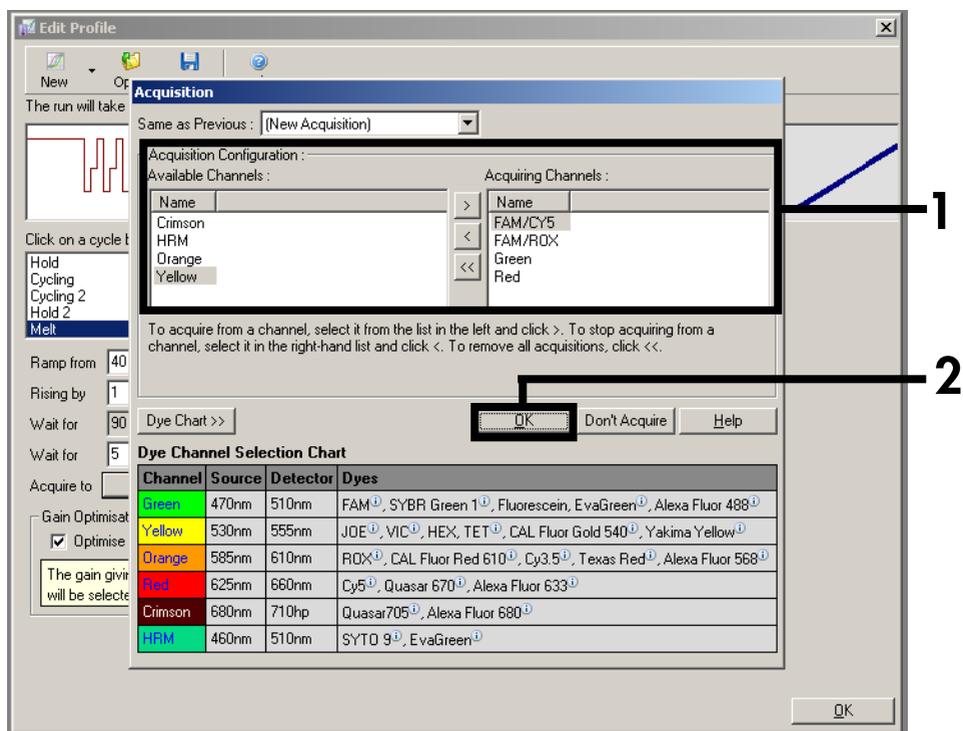


Figura 14. Selezione di tutti i canali necessari per l'acquisizione.

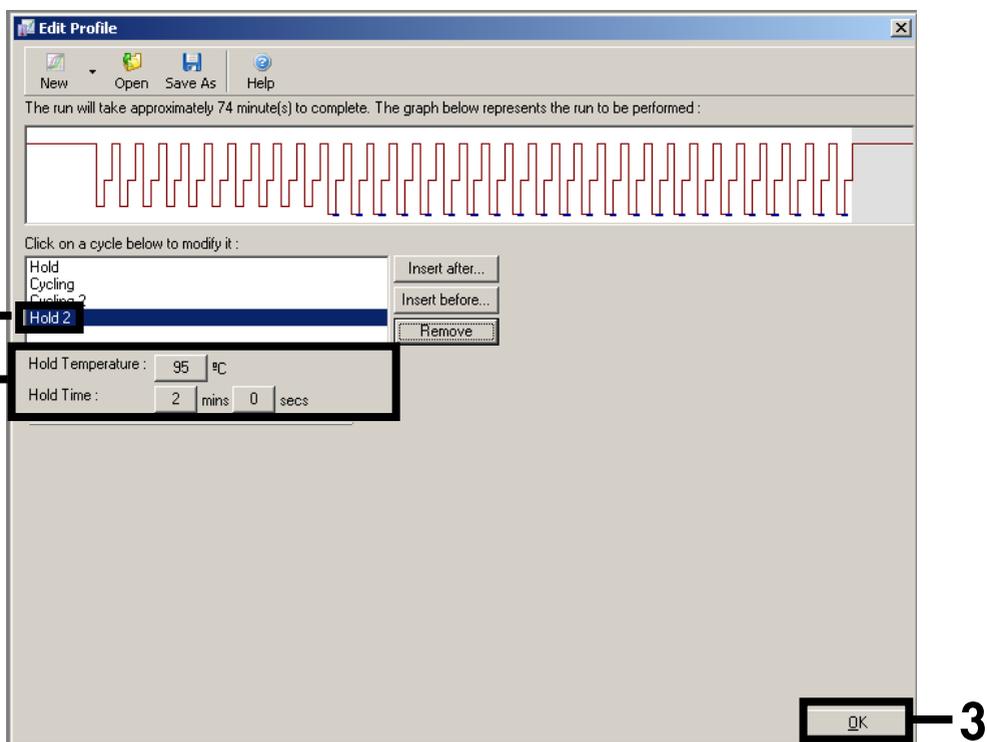


Figura 15. Denaturazione dei prodotti della PCR.

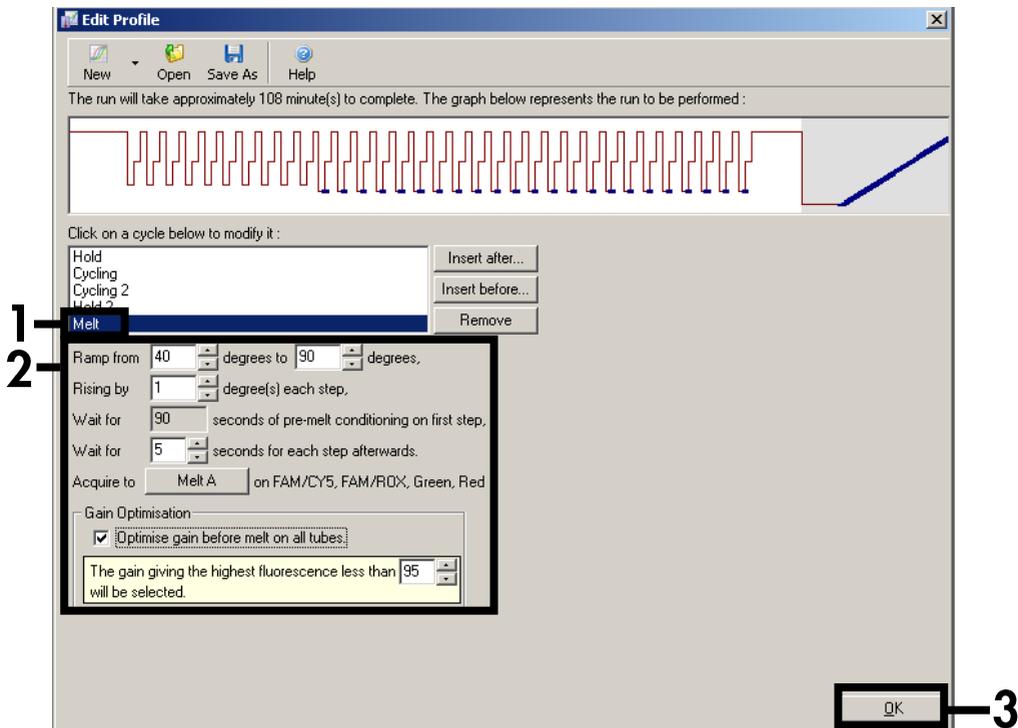


Figura 16. Programma di melting.

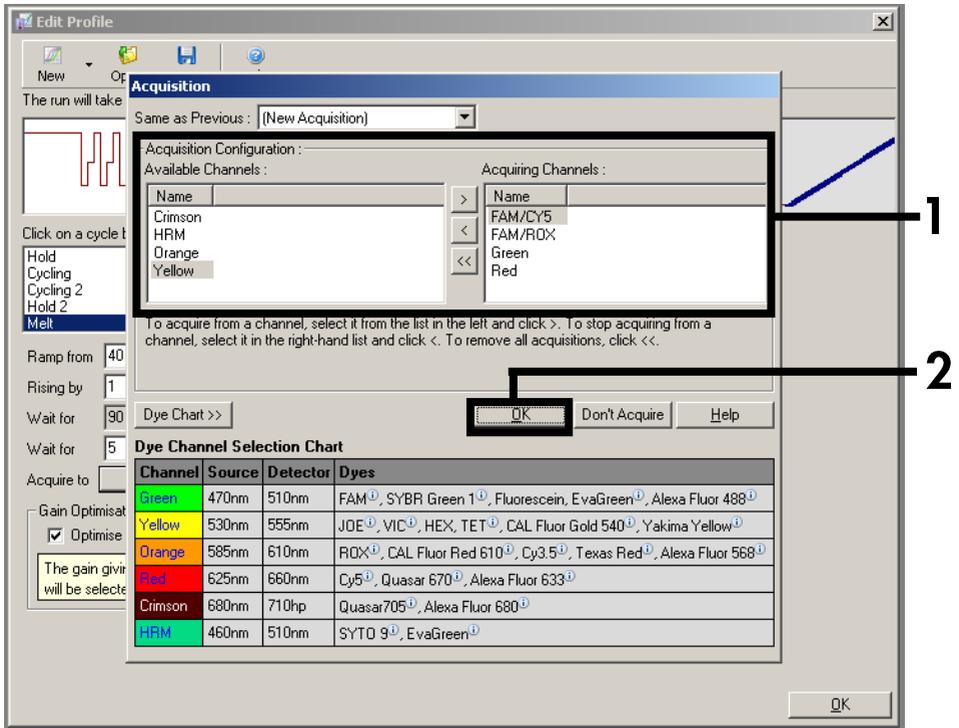


Figura 17. Acquisizione durante il programma di melting.

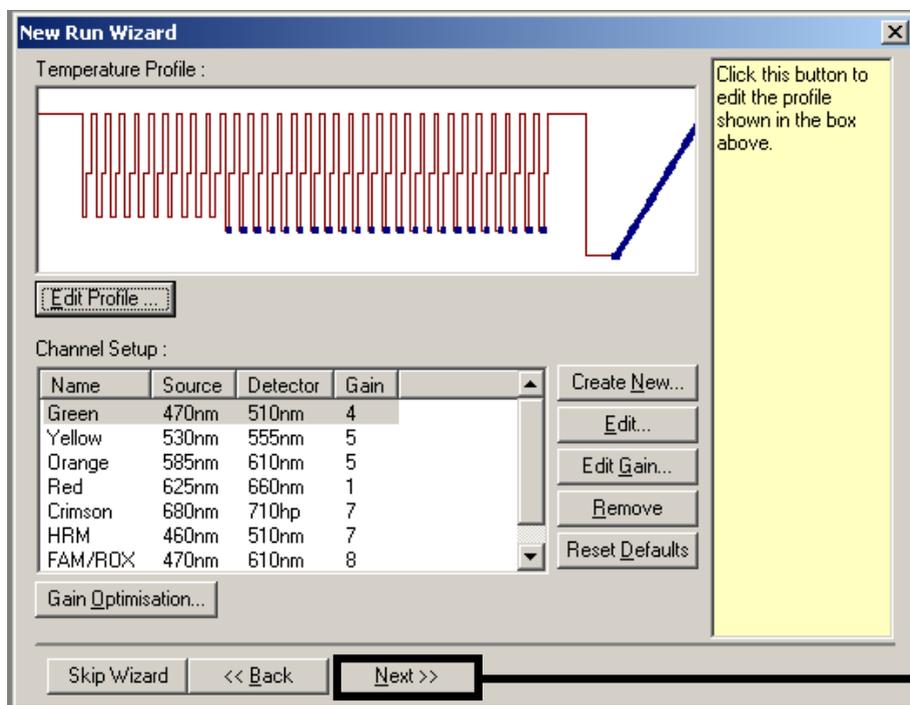


Figura 18. Riepilogo del profilo termico.

12. Salvataggio dello stampo per eventuali usi successivi (Figura 19).

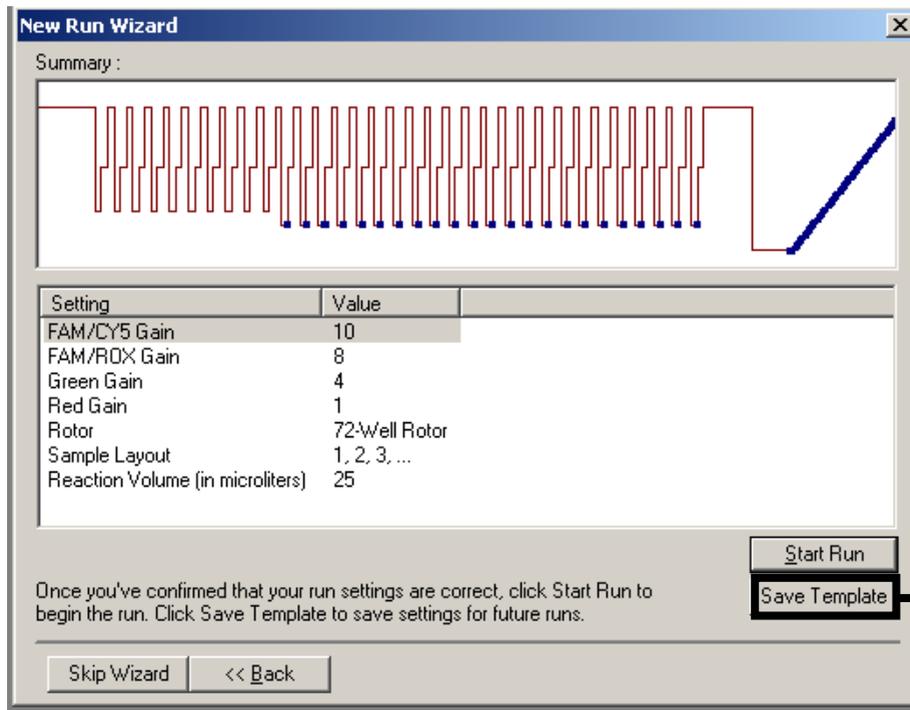


Figura 19. Salvataggio dello stampo per eventuali usi successivi.

13. Preparare la miscela 1 di Fase 2 come indicato nella Tabella 11 e la miscela 2 di Fase 2 come indicato nella Tabella 12, quindi miscelare delicatamente ma con cura.

Se le miscele di Fase 2 sono già state preparate nella fase 1, attendere che il programma di pre-amplificazione sia terminato, poi passare alla fase 14.

Tabella 11. Preparazione della miscela 1 di Fase 2

Numero di campioni (colore del tappo della provetta di reagente)	1	12
Tampone 1 RespiFast (rosso)	19 µl	228 µl
Enzima RespiFast (arancione)	1 µl	12 µl
Volume totale miscela 1 di Fase 2	20 µl	240 µl

Tabella 12. Preparazione della miscela 2 di Fase 2

Numero di campioni (colore del tappo della provetta di reagente)	1	12
Tampone 2 RespiFast (blu)	19 µl	228 µl
Enzima RespiFast (arancione)	1 µl	12 µl
Volume totale miscela 2 di Fase 2	20 µl	240 µl

14. Per ogni campione pipettare 20 µl della miscela 1 di Fase 2 in una nuova provetta per strisce per PCR per Rotor-Gene, poi pipettare 20 µl della miscela 2 di Fase 2 in una provetta per strisce per PCR per Rotor-Gene.

15. Terminato il programma di pre-amplificazione (fase 5), estrarre le provette per PCR dal termociclatore e centrifugarle brevemente. Pipettare 5 µl di ogni reazione di pre-amplificazione in ciascuna delle 2 provette per strisce per PCR, una con la miscela 1 di Fase 2 e una con la miscela 2 di Fase 2 (vedere la Tabella 13).

Tabella 13. Preparazione delle reazioni di Fase 2

Numero dei campioni	1	12
Miscela 1 di Fase 2	20 µl	20 L ciascuno
Reazione di pre-amplificazione	5 µl	5 L ciascuno
Volume totale	25 µl	25 L ciascuno
Miscela 2 di Fase 2	20 µl	20 L ciascuno
Reazione di pre-amplificazione	5 µl	5 L ciascuno
Volume totale	25 µl	25 L ciascuno

16. Chiudere le provette per strisce con i rispettivi tappi e collocarle nel rotore dello strumento Rotor-Gene Q.

17. Posizionare il rotore sullo strumento Rotor-Gene Q. Verificare che l'anello di bloccaggio (accessorio dello strumento Rotor-Gene) sia presente sopra il rotore per evitare l'apertura accidentale delle provette durante il processo.

18. Avviare il processo (**Figura 20**) utilizzando lo stampo salvato (fase 12).

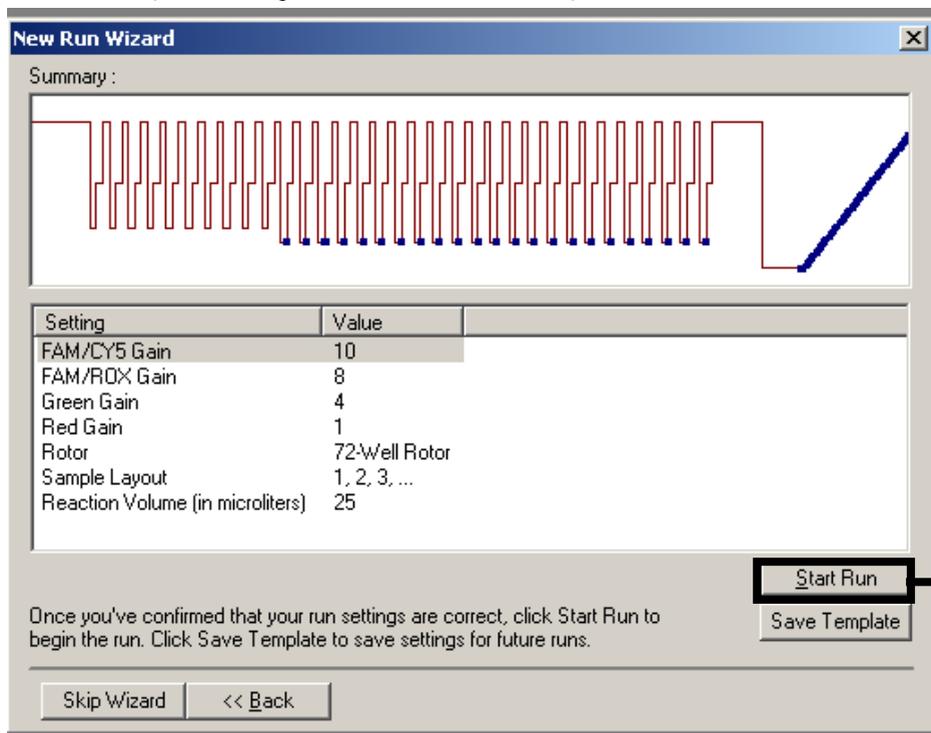


Figura 20. Avvio del processo.

Interpretazione dei risultati

Normalizzazione

Sugli strumenti Rotor-Gene Q occorre innanzi tutto normalizzare i dati non elaborati per il canale FAM/Cy5 per compensare eventuali problemi di diafonia fra i diversi canali.

Per normalizzare i segnali Cy5 aprire il canale dei dati non elaborati Melt A.FAM/Cy5 (impostazioni di filtraggio 470–660 nm). Cliccare sul pulsante “Option” (Opzione) e selezionare “Normalise to Melt A.FAM/ROX” (Normalizza a Melt A.FAM/ROX). Il file dei dati non elaborati generato **Melt A.FAM/Cy5/Melt A.FAM/ROX** deve essere normalizzato anche per il canale Red (impostazioni di filtraggio 625/660 nm). A tale scopo, aprire il nuovo file dei dati non elaborati **Melt A.FAM/Cy5/Melt A.FAM/ROX**, cliccare sul pulsante “Option” e selezionare “Normalise to Melt A.Red” (Normalizza a Melt A.Red). Con questa normalizzazione si corregge la fluorescenza temperatura-dipendente di Cy5, ottenendo un picco di melting più simmetrico.

Analisi

Per analizzare il file dei dati non elaborati, aprire la finestra “Analysis” (Analisi) e selezionare il corretto file dei dati non elaborati normalizzati per FAM/Cy5 sotto la scheda “Melt”. I segnali nel canale Green (IC) (impostazioni di filtraggio 470–510 nm) e nel canale FAM/ROX (impostazioni di filtraggio 470–610 nm) non devono essere normalizzati; sono selezionati anche corrispondenti file dei dati non elaborati per i canali FAM/ROX e Green. Le diverse temperature di melting delle sonde SMART sono indicate nella Tabella 14, pag. 47.

Soglia

Utilizzando l'ottimizzazione del gain nel software del Rotor-Gene Q nel programma di melting della reazione di Fase 2 del pannello RespiFast RG come descritto nella Tabella 10 (pag. 24) e nella **Figura 16** (pag. 39), si raccomanda di impostare i seguenti valori soglia nei grafici di analisi della curva di melting per analizzare i risultati dei campioni.

- Canale FAM/ROX: Soglia = 1
- Canale FAM/Cy5 (normalizzato): Soglia = 0
- Canale Green (IC): Commutare il segno di dF/dT e selezionare tutti i campioni che non hanno mostrato un picco di melting positivo nei canali FAM/ROX e FAM/Cy5 con entrambe le miscele. Impostare manualmente la soglia al massimo livello di fluorescenza tra 40 e 45 °C ottenuto con questi campioni negativi. I campioni che presentano picchi di melting con entrambe le miscele entro il range di accettazione di T_m del controllo interno e dei controlli di amplificazione possono essere ora definiti campioni veri negativi (vedere esempio nella **Figura 21**). I campioni che presentano un solo o nessun controllo interno positivo oppure un solo o nessun controllo di amplificazione devono essere definiti non validi. I campioni non validi devono essere analizzati di nuovo.

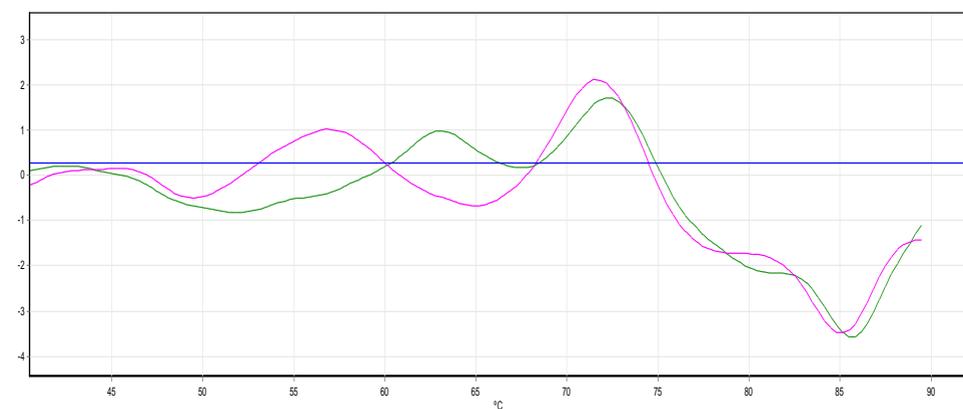


Figura 21. Esempio di campione negativo rilevato nel canale Green: In verde reazione miscela 1, in rosa reazione miscela 2. La soglia è definita sul livello di fluorescenza più elevato tra 40 e 45 °C.

Tabella 14. Bersagli e corrispondenti valori di T_m delle sonde SMART

Etichetta	Sonda SMART	Range di accettazione T_m (°C)	Codice patogeno (miscela 1)	Codice patogeno (miscela 2)
Cy5	Sonda Cy5 1	50,5-53,5*	L. pneu	OC43
	Sonda Cy5 2a	55-58	B. pert	-
	Sonda Cy5 2b	52,5-55.	-	HKU1/NL63
	Sonda Cy5 3	60,5-63,5	Rhino/Entero	
		58,5-61,5		229E
	Sonda Cy5 4	66,5-69,5	C. pneu	-
	Sonda Cy5 5	70,5-73,5	M. pneu	-
	Sonda Cy5 6	76-79	-	H1N1
ROX	Sonda ROX 1	53,5-56,5	RSVA	PIV1
	Sonda ROX 2	58-61	Adeno	PIV2
	Sonda ROX 3	62,5-65,5	hMPV	PIV3
	Sonda ROX 4	66,5-69,5	RSVB	PIV4
	Sonda ROX 5	72,5-75,5	InfA	Boca
	Sonda ROX 6	76,5-79,5	InfB	-
BHQ1	Sonda BHQ1 1	70,5-73,5	IC	IC
	Sonda BHQ1 AC1	61-64	AC1	-
	Sonda BHQ1 AC	55,5-58,5	-	AC2

* I picchi della sonda Cy5 1 a volte appaiono come picco doppio. Il valore T_m del secondo picco è quello corretto.

Una panoramica dei risultati della curva di melting sono riportati nella Tabella 15.

Tabella 15. Risultati della curva di melting del pannello RespiFast RG

Reazione campione RespiFast								Risultato del campione
Miscela 1				Miscela 2				
FAM				FAM				
ROX	Cy5	IC	AC1	ROX	Cy5	IC	AC2	
+	-	+/-	+/-	-	-	+/-	+	Bersaglio ROX 1 positivo*
-	+	+/-	+/-	-	-	+/-	+	Bersaglio Cy5 1 positivo*
-	-	+/-	+	+	-	+/-	+/-	Bersaglio ROX 2 positivo*
-	-	+/-	+	-	+	+/-	+/-	Bersaglio Cy5 2 positivo*
-	-	+	+	-	-	+	+	Negativo
+	+	+/-	+/-	-	-	+/-	+	Bersagli ROX1 e Cy5 1 positivi*
-	-	+/-	+	+	+	+/-	+/-	Bersagli ROX 2 e Cy5 2 positivi*
+	-	+/-	+/-	+	-	+/-	+/-	Bersagli ROX1 e ROX 2 positivi*†
-	+	+/-	+/-	-	+	+/-	+/-	Bersagli Cy5 1 e Cy5 2 positivi*†
+	-	+/-	+/-	-	+	+/-	+/-	Bersagli ROX1 e Cy5 2 positivi*†
-	+	+/-	+/-	+	-	+/-	+/-	Bersagli Cy5 1 e ROX 2 positivi*†
+	-	+/-	+/-	-	-	-	-	Non valido a causa di nessuna reazione Miscela 2
-	+	+/-	+/-	-	-	-	-	Non valido a causa di nessuna reazione Miscela 2
-	-	-	-	+	-	+/-	+/-	Non valido a causa di nessuna reazione Miscela 1
-	-	-	-	-	+	+/-	+/-	Non valido a causa di nessuna reazione Miscela 1
-	-	-	-	-	-	-	-	Non valido
-	-	-	+	-	-	-	+	Estrazione non corretta non valida/nessun campione aggiunto alla reazione 2SMART

* Il o i patogeni corrispondenti sono riportati nella Tabella 14.

† È possibile qualsiasi combinazione di questi risultati, ottenendo un risultato positivo per i bersagli multipli rilevati con la Miscela 1 e la Miscela 2 in entrambi i canali di rilevazione ROX e Cy5.

Nota: una reazione della miscela del pannello RespiFast RG è convalidata dalla presenza di una delle seguenti condizioni:

- Picco di melting di patogeni positivo
- Picco di melting di AC positivo e picco di IC positivo
- Picco di melting di AC positivo (IC è surclassato a causa della forte infezione da patogeni rilevata con la corrispondente miscela di fase 2 RespiFast).

Le reazioni non valide devono essere ripetute. Quando una sola delle due reazioni di Fase 2 RespiFast di un campione presenta un risultato, la reazione non valida del pannello RespiFast RG deve essere ripetuta, iniziando con la reazione di pre-amplificazione (utilizzando gli acidi nucleici estratti disponibili).

Quando un campione presenta un risultato del campione non valido a causa dell'assenza di patogeni, di IC e di AC oppure a causa dell'assenza di patogeni e di IC, la reazione del pannello RespiFast RG deve essere ripetuta partendo dall'estrazione degli acidi nucleici del campione originale.

Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per chiarire eventuali dubbi che possano presentarsi. Per maggiori informazioni, consultare anche la pagina relativa alle domande frequenti (FAQ) nel nostro servizio di assistenza tecnica: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Gli esperti del servizio di assistenza tecnica di QIAGEN sono sempre lieti di rispondere a qualsiasi domanda possiate avere per quanto riguarda le informazioni ed i protocolli presenti in questo manuale, oppure le tecnologie per campioni e test (per le informazioni sui contatti, consultare il retro di copertina o visitare il sito www.qiagen.com).

Commenti e suggerimenti

Non sono visibili picchi di melting specifici e neppure un picco di melting dell'IC

- | | |
|---|---|
| a) Errore/i di programmazione nel programma di ciclizzazione termica | Programmare il termociclatore secondo il "Protocollo: amplificazione mediante PCR e analisi della curva di melting", pag. 21, e ripetere il test. |
| b) Errore di pipettatura o reagente mancante | Ripetere il test RespiFast seguendo il "Protocollo: amplificazione mediante PCR e analisi della curva di melting", pag. 21. |
| c) IC non aggiunto o IC aggiunto prima di aggiungere il tampone di lisi al campione | È importante aggiungere l'IC e il carrier RNA al tampone di lisi, preferibilmente dopo che lo stesso è stato aggiunto al campione, indipendentemente dal protocollo di estrazione utilizzato (vedere "Utilizzo di un controllo interno e del carrier RNA", pag. 16). In caso contrario, l'IC potrebbe subire una degradazione a causa delle nucleasi presenti nel campione. Ripetere l'estrazione degli acidi nucleici e il test RespiFast. |
| d) Inibitori della PCR presenti nel campione | Ripetere il test utilizzando una diluizione di cinque volte dell'RNA/DNA isolato. |

Nessun picco di melting dell'IC visibile in presenza di picchi di melting specifici dei patogeni

Intensa infezione e/o infezione multipla	L'IC è stato surclassato nel test. Il risultato è ancora valido.
--	--

Sono visibili falsi picchi di melting

Commenti e suggerimenti

Cross-contaminazione

Accertarsi che le fasi di reazione vengano eseguite in stanze separate per evitare cross-contaminazione.

Ripetere il test RespiFast.

Controllare il programma di ciclizzazione e accertarsi che tutte le fasi operative vengano eseguite come descritto nel "Protocollo: amplificazione mediante PCR e analisi della curva di melting", pag. 21. Accertarsi di operare su ghiaccio dove indicato nel protocollo.

Ripetere il test RespiFast.

Controllo di qualità

Il pannello RespiFast RG è prodotto da PathoFinder BV a Maastricht, Paesi Bassi, in conformità con sistemi di qualità certificati secondo la norma ISO13485:2012.

Limiti della metodica

Il pannello RespiFast RG è un valido ausilio nella diagnosi delle infezioni delle vie aeree se utilizzato in associazione ad altri riscontri clinici e di laboratorio. Eventuali risultati negativi non indicano necessariamente l'assenza di un'infezione virale o batterica delle vie aeree. Per questo motivo, eventuali risultati negativi non devono essere utilizzati come unica base per formulare una diagnosi, avviare una terapia o adottare altre decisioni terapeutiche. Eventuali risultati positivi non escludono la co-infezione da altri patogeni. I patogeni rilevati potrebbero non essere l'esatta causa della patologia.

Nella formulazione della diagnosi finale devono essere inclusi anche altri esami di laboratorio e la valutazione di manifestazioni cliniche.

Il prodotto è concepito per l'uso esclusivamente da parte di esperti di laboratorio.

Caratteristiche delle prestazioni

Visitare il sito www.qiagen.com/p/RespiFast-RG-Panel-CE per informazioni sulle caratteristiche delle prestazioni del pannello RespiFast RG.

Simboli

I seguenti simboli possono comparire sulla confezione e sull'etichettatura:

Simbolo	Definizione
	Contenuto sufficiente per <N> test
	Data di scadenza
	Dispositivo medico per diagnostica in vitro
	Numero di catalogo
	Numero di lotto
	Numero di materiale
	Codice GTIN
	Limite di temperatura
	Produttore
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Attenzione
	Evitare la luce solare diretta

Informazioni sui contatti

Per ricevere assistenza tecnica e ulteriori informazioni, potete consultare il nostro sito www.qiagen.com/Support, chiamare il numero 00800-22-44-6000 o contattare il servizio di assistenza tecnica QIAGEN o il distributore locale (consultate il retro di copertina o visitare il sito www.qiagen.com).

Informazioni per gli ordini

Prodotto	Contenuto	Cat n°
Pannello RespiFast RG	CE IVD, per 25 reazioni: Miscela master di pre-amplificazione, controllo interno, miscela primer per pre-amplificazione, tamponi RespiFast, enzima RespiFast, controllo positivo	4693163
Kit QIAamp MinElute Virus Spin — per la purificazione simultanea del DNA e RNA virale da tamponi nasofaringei		
QIAamp MinElute Virus Spin Kit (50)	Per 50 minipreparazioni: 50 colonne QIAamp MinElute, proteasi QIAGEN, carrier RNA, tamponi, provette di raccolta (2 ml)	57704
Kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini — per la purificazione simultanea del DNA e RNA virale da tamponi nasofaringei da utilizzare con lo strumento QIASymphony SP		
QIASymphony Virus/Pathogen Mini Kit	DSP Per 192 preparazioni (da 200 µl cad.): include 2 cartucce reagenti, rack per enzima e accessori	937036
QIASymphony SP		
Modulo per la preparazione dei campioni QIASymphony, garanzia di 1 anno sulle parti e sulla funzionalità di laboratorio		9001297

Rotor-Gene Q MDx — per l'analisi PCR in tempo reale convalidata per l'uso diagnostico in vitro in applicazioni cliniche

Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Termociclatore per PCR in tempo reale e analizzatore per fusione ad alta risoluzione a 5 canali (verde, giallo, arancione, rosso, cremisi) più canale HRM, notebook, software, accessori: include la garanzia di 1 anno sulle parti e sulla funzionalità di laboratorio; installazione e addestramento non incluse	9002032
-------------------------------------	--	---------

Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Termociclatore per PCR in tempo reale e analizzatore ad alta risoluzione a 5 canali (verde, giallo, arancione, rosso, cremisi) più canale HRM, notebook, software, accessori: include la garanzia di 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio; installazione e addestramento	9002033
-----------------------------------	---	---------

Rotor-Gene Q — per prestazioni eccezionali di PCR in tempo reale

Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform	Termociclatore per PCR in tempo reale e analizzatore per fusione ad alta risoluzione a 5 canali (verde, giallo, arancione, rosso, cremisi) più canale HRM, notebook, software, accessori: include la garanzia di 1 anno sulle parti e sulla funzionalità di laboratorio; installazione e addestramento non incluse	9001580
---------------------------------	--	---------

Rotor-Gene Q 5plex HRM System	Termociclatore per PCR in tempo reale e analizzatore ad alta risoluzione a 5 canali (verde, giallo, arancione, rosso, cremisi) più canale HRM, notebook, software, accessori: include la garanzia di 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio; installazione e addestramento	9001650
-------------------------------	---	---------

Accessori del Rotor-Gene Q

Provette per strisce e tappi, 0,1 ml (250)	250 strisce di 4 provette e tappi per 1000 reazioni da 10–50 µl	981103
Provette per strisce e tappi, 0,1 ml (2500)	10 x 250 strisce di 4 provette e tappi per 10.000 reazioni da 10–50 µl	981106

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i disclaimer specifici dei prodotti, consultare il manuale del kit o il manuale utente QIAGEN. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili nel sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza tecnica QIAGEN o al proprio distributore locale.

Marchi commerciali: QIAGEN®, QIAamp®, MinElute®, QIASymphony®, Rotor-Gene® (Gruppo QIAGEN); BHQ® (Biosearch Technologies, Inc.); Cy® (GE Healthcare); FAM™, GeneAmp®, ROX™ (Life Technologies Corporation); SmartFinder (PathoFinder B.V.).

Contratto di Licenza Limitato per il pannello RespiFast RG

L'uso di questo prodotto implica l'accettazione da parte dell'acquirente o dell'utente del prodotto dei seguenti termini:

1. Questo prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità ai protocolli forniti insieme al prodotto e al presente manuale e soltanto con i componenti contenuti nel pannello. QIAGEN non concede alcuna licenza, in relazione a qualunque proprietà intellettuale, per l'uso o l'aggiunta dei componenti del pannello ad altri componenti non contenuti nel test, ad eccezione di quanto descritto nei protocolli forniti insieme al prodotto, nel presente manuale e nei protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com. Alcuni di questi protocolli aggiuntivi sono stati forniti da utenti QIAGEN per altri utenti QIAGEN. Tali protocolli non sono stati completamente testati od ottimizzati da QIAGEN. QIAGEN non garantisce in alcun modo che non violino i diritti di terze parti.
2. Se non espressamente dichiarato nelle licenze, QIAGEN non garantisce in alcun modo che questo pannello e/o il relativo impiego non violino i diritti di terze parti.
3. Il presente pannello ed i relativi componenti sono concessi in licenza per l'impiego monouso e non possono essere riutilizzati, ripristinati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del pannello concordano nel non consentire a nessuno di intervenire o consentire ad altri di realizzare o contribuire a realizzare azioni proibite. QIAGEN può imporre presso qualunque tribunale i divieti del presente Contratto di Licenza Limitato e recupererà tutte le spese di indagine e spese legali, comprese le parcelle degli avvocati, in qualunque azione per imporre il presente Contratto di Licenza Limitato o qualsiasi diritto di proprietà intellettuale correlato al pannello e/o ai suoi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, consultare il sito www.qiagen.com.

Nota per l'acquirente

Questo prodotto è realizzato da PathoFinder BV a Maastricht, Paesi Bassi, in conformità con sistemi di qualità certificati secondo la norma ISO13485:2012. Questi prodotti vengono venduti esclusivamente per l'uso da parte dell'utente finale e non possono essere rivenduti, distribuiti o reimballati.

© 2015 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente

Ordini www.qiagen.com/contact | Assistenza tecnica support.qiagen.com | Sito web www.qiagen.com